
EXPRESSION OF SELECTED COR/LEA GENES IN WINTER WHEAT PLANTS DURING WILTING

EXPRESE VYBRANÝCH COR/LEA GENŮ U PŠENICE OZIMÉ V PRŮBĚHU VADNUTÍ ROSTLIN

Truhlářová E., Smutná P., Holková L.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: eva.truhlarova@mendelu.cz

ABSTRACT

Drought tolerance of plants is a complex character influenced both constitutive and stress responsible traits.

The aim of this work was to identify differences in wheat seedlings responses to drought stress at the physiological a molecular level. The plants of three winter wheat varieties (Meritto, Etela and Venistar) and a Syrian line with different tolerance to drought were cultivated until the stage of 4-5 leaves and then subjected to drought. Stress reaction of plants was evaluated by Relative Water Content (RWC) and Osmotic Pressure (OP) in leaves and by expression level of two *Cor/Lea* genes (*Wdhn13* and *Wrab17*).

The obtained results clearly indicate a relation between the expressions of both genes and tissue water content; the reduction in RWC was strongly connected with changes in genes activity. Particularly the *Wdhn13* gene expression in Meritto variety increased even though the tissue hydration level was only slightly reduced, which can be related to the good adaptiveness of this genotype to stress.

Key words: winter wheat, drought tolerance, expression, *Cor/Lea* genes

Acknowledgments: This study was supported by the Internal Grant Agency of Faculty of Agronomy in Mendel University in Brno, project TP 10/2012.

ÚVOD

Vzhledem k výrazným klimatickým změnám, které s sebou přinášejí vyšší teploty, nižší srážky a jejich nevyrovnané rozložení během vegetačního období, ukazuje se jako stále aktuálnější výběr tolerantnějších genotypů. Zvýšení výnosu zemědělských plodin v suchých podmínkách je cílem výzkumů po celém světě. Při výběru genotypů nezáleží jen na přežití rostlin v podmínkách vodního deficitu, ale v případě hospodářských plodin i na získání kvalitního výnosu v podmínkách sucha (Bláha, 2011), (Shabala, 2012).

Po vystavení rostlin stresovým podmínkám u nich dochází k indukci celé řady biochemických a fyziologických změn, které směřují k vytvoření ochranných mechanismů zaměřených na účinné využívání dostupné vody, přičemž nejodolnější genotypy bývají ty, které vykazují toleranci na více úrovních současně (Riechmann et al. 2000). Snížení RWC v průběhu indukovaného stresu pozoroval Keyan (2010) na rostlinách pšenice. Zjištěné rozdíly mezi některými genotypy vysvětluje lepší schopností absorbovat vodu z půdy nebo lepší možnosti zabránit ztrátám vody. Dle Keyana (2010) genotypy, které jsou odolnější suchu, mají vyšší relativní obsah vody v listech. Sucho je spojeno s nedostatkem vody v buňce, a proto akumulace dehydrinových proteinů velmi často koreluje s odolností rostliny k stresovým podmínkám a mohly by být významnými aplikovatelnými markery suchovzdornosti rostlin (Atienza et al. 2004). V posledních letech jsou pro hodnocení citlivosti rostlin vůči abiotickému stresu využívány také postupy vycházející z hodnocení exprese ochranných genů ze skupiny *Cor/Lea* (např. Suprunova et al., 2004).

Cílem naší práce bylo porovnat meziodrůdové rozdíly v některých fyziologických znacích a expresi ochranných genů ze skupiny *Cor/Lea* (*Wdhn13* a *Wrab17*), které by bylo možné použít jako návrh selekčních kritérií při výběru vhodných odrůd do suchých podmínek pro další šlechtění a současně sledovat reakce odlišných genotypů na stejné stresové podmínky.

MATERIÁL A METODIKA

Pro porovnání stresové reakce na náhlé suchu v růstové vegetativní fázi byly vybrány tři odrůdy pšenice ozimé (Meritto, Etela a Venistar) pěstované v naší republice a jedna syrská syntetická linie pocházející z ICARDA Sýrie. Zvolené odrůdy se liší citlivostí vůči suchu. Jejich hodnocení probíhalo v rámci víceletých pokusů, při kterých byly hodnoceny výnosy na suchých lokalitách a v nádobových pokusech při pěstování v řízených režimech omezené závlivky. Nejcitlivější vůči suchu se jevila odrůda Etela. Venistar je odrůda doporučovaná do suchých podmínek a také odrůda Meritto vykazovala značnou toleranci vůči suchu. O syntetickou linii S1, kterou jsme zařadily do hodnocení, nejsou zatím dostupné informace o úrovni citlivosti vůči suchu.

Pšenice byly vysety do truhlíku s hrubým perlitem (od každé odrůdy 3 truhlíky po 20 rostlinách). Rostliny byly nechány v režimu 12 hodinového dne při teplotách 18°C a 12 hodinové noci při teplotách 10°C až do stádia 3-4 pravých listů. Odrůda Merrito za stejných podmínek narostla o 1 pravý list více než ostatní. Rostliny byly vytaženy z truhlíku a osušeny na filtračním papíru. Rozdíly mezi genotypy v reakci na vodní stres byly měřeny pomocí RWC (Relative water contents). Fyziologické hodnocení RWC bylo hodnoceno dle Barr and Weatherley, (1962). Odstřižené, nepoškozené, druhé nejmladší listy se zvážily (Hodnota H₀) a ponechaly 4 hodiny na světle v uzavřené nádobě na hladině vody (Petriho miska). Po této době jsme listy zvážily (H_S) a následně vysušily do konstantní hmotnosti (H_d). Rostliny dobře zásobené vodou mají RWC mezi 90-100 %, hodnoty okolo 70 % indukují silný stres. RWC souvisí s velikostí buňky a může silně odrážet rovnováhu mezi přívodem vody do listů a transpirací Fisher and Wood, (1979).

$$\text{RWC (\%)} = 100 * (H_0 - H_S) / (H_S - H_d)$$

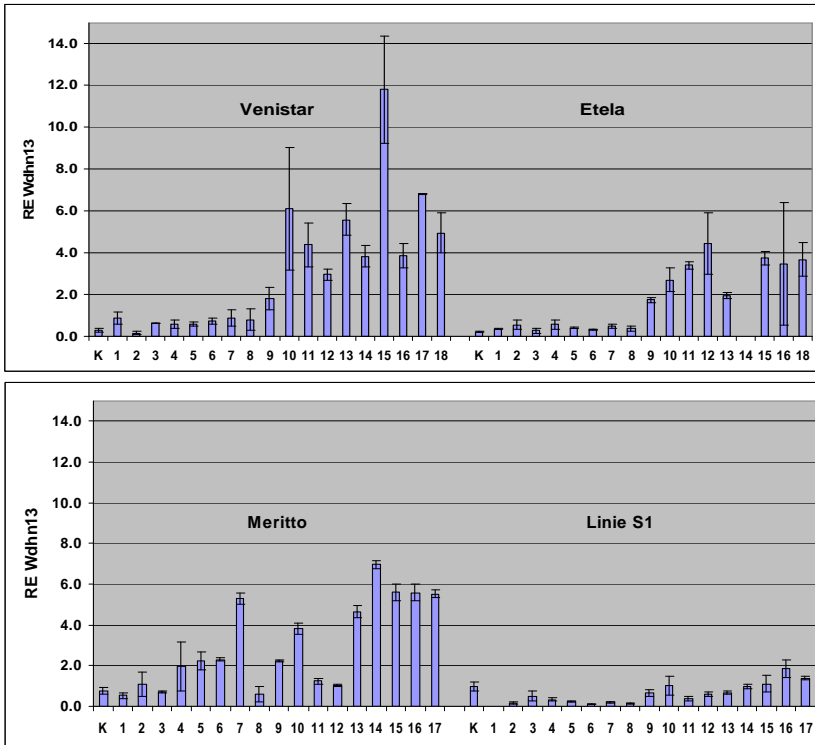
Vzorky na hodnocení osmotického potenciálu byly odebírány v 11 odběrech z nejmladších listů usychajících rostlin a vloženy do sterilních plastových stříkaček a zamrazen. OP (Osmotic potencial) byl měřen pomocí přístroje VAPRO 5600 (Vapor pressure osmometr) v nejmladší části usychajících rostlin. Po rozmrazení byla tlakem vytlačena tekutina pro měření hodnoty osmolarity, která byla vynásobena koeficientem (-0,00227) na hodnotu osmotického potenciálu.

Vzorky na izolaci byly odebírány v 19 časových intervalech. K-kontrola, 1-10 min, 2-15 min, 3-20 min, 4-25 min, 5- 30 min, 6-60 min, 7-90 min, 8-2h, 9-3h, 10-4h, 11-5h, 12-6h, 13-7h, 14-8h, 15-9h, 16-10h, 17-12h, 18-24h. Izolace RNA, syntéza cDNA a qPCR byly provedeny za pomoci komerčních kitů dle standardních protokolů. V PCR reakcích byly použity již známé genově specifické primery (Kobayashi et al., 2008, Holková et al., 2009). Podmínky reakcí pro jednotlivé geny byly částečně převzaty z Holková et al., 2009 a optimalizovány. Relativní exprese genů byla počítána dle Pfaffl, 2001. Hodnocení exprese bylo provedeno proti referenčnímu genu ubiquitin.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V podmínkách postupného usychání celých rostlin byla hodnocena exprese dvou genů (*Wdh13* a *Wrab17*). Oba geny jsou aktivovány suchem a proteiny, které tyto geny kódují, jsou zapojeny v ochranných mechanismech rostlinných buněk proti vysychání (Kobayashi et al., 2008). Rychlejší nástup či vyšší úroveň exprese odpovídajících genů v závislosti na stresovém stavu rostlin by měly být vlastností tolerantnějších genotypů. Nástup a průběh exprese obou genů byla sledována v průběhu postupného usychání rostlin za přesně definovaných podmínek, aby bylo možno porovnat předpokládané odrůdové rozdíly. Úroveň exprese genu *Wrab17* byla v porovnání s úrovní exprese genu *Wdh13* poměrně nízká a v průběhu usychání rostlin značně kolísala, proto jsme se zaměřili více na hodnocení exprese genu *Wdh13* (obr. 1).

Obr.1 Hodnocení relativní exprese (RE) genu *Wdhn13* v průběhu postupného usychání rostlin pšenice ozimé; porovnání reakce 4 různých odrůd /linie s odlišnou citlivostí vůči suchu



Nástup aktivity tohoto genu se projevil nejdříve u odrůdy Meritto. Již po 25 minutách od vytažení rostlin z truhlíku bylo zaznamenáno dvojnásobné zvýšení oproti kontrolním rostlinám. K dalšímu nárůstu exprese došlo po 90 minutách (7. odběr) a po 7 hodinách postupného usychání došlo k ustálení exprese tohoto genu na 5-7 násobek oproti kontrolám. U odrůdy Venistar byly sice zaznamenány ve dvou odběrech (4 a 9 hodin usychání) až dvojnásobně vyšší hodnoty relativní exprese tohoto genu, ale počáteční zvýšení exprese nad úroveň kontrol bylo zaznamenáno až v 9. odběru, tedy až po 3 hodinách postupného usychání. Podobná dynamika exprese hodnoceného genu byla pozorována u odrůdy Etela a linie S1. Úroveň exprese celkově však byla oproti Merittu a Venistar nižší, což bylo patrné hlavně u linie S1. Jak ukázalo následné porovnání hodnot relativní exprese tohoto genu se postupem vadnutí vyjádřeného hodnotami RWC (obr. 2) dřívější nástup zvyšování exprese genu *Wdhn13* u odrůdy Meritto nesouvisel s úrovní vadnutí. Došlo k němu v době, kdy si rostliny ještě udržovaly vysoký obsah vody v listech (RWC = 90%). Podobný jev zaznamenali ve svých experimentech Rampino et al., (2006) u pšenice tvrdé (*T. durum*) Aktivace

exprese jimi sledovaných genů ze skupiny *Cor/Lea* byla u genotypů tolerantnějších vůči suchu zaznamenávána dřívě (při vyšších hodnotách RWC) než u genotypů citlivějších. Proč nebyl podobný mechanismus pozorován u odrůdy Venistar není jasné. Při růstu v přirozených podmínkách je zřejmě nahrazen jiným ochranným nebo regulačním mechanismem. Podobně tomu může být u syntetické linie S1, ale u ní není jisté, zda je vůči suchu tolerantní. Poškození porostu této linie v polních podmínkách po zimě 2011/2012 (data zde neuvedena) ukazuje na obecně nižší toleranci k abiotickému stresu, což by bylo v souladu s výsledkem našeho experimentu.

Těsný vztah mezi úrovní vysychání a následného vadnutí rostlin vyjádřenou hodnotami RWC a OP a úrovní stresové reakce hodnocené na úrovni relativní exprese obou genů (*Wdhn13* i *Wrab17*) je vyjádřen pomocí statisticky průkazných hodnot korelačních koeficientů (tab. 1). Korelační koeficienty dokazují závislost relativní exprese genu *Wdhn13* a *Wrab17* na RWC i OP u odrůdy Venistar. U odrůdy Etela byla zjištěna závislost RWC a OP pouze u genu *Wdhn13* a u odrůdy Meritto byla prokázána závislost genu *Wdhn13* pouze na RWC. U syntetické syrské linie je závislost RWC i OP u obou genů. Dle Kamoshita et al., 2008 jsou genotypy, které udrží vyšší RWC odolnější vůči suchu, protože mají vyšší stav vnitřní vody. Z našich hodnocených genotypů (obr. 2) si po dobu vysychání dokázala udržet vyšší hodnotu RWC nad 70 % až do 90 minut po vytažení z truhlíku odrůda Meritto. Odrůda Meritto patří v našich klimatických podmínkách k tzv. stabilním odrůdám, pro které je typický stabilní výnos v různých prostředích (Smutná a Ryšková 2012). Tahara et al., (1990) pozorovali pozitivní vztah mezi výnosem zrna a RWC měřeným v průběhu reprodukčního stádia u pšenice. Odrůdy s vyšší výtěžností udržovaly výrazně vyšší RWC než málo výnosné odrůdy. Nižší pokles RWC vlivem suchem indukovaného stresu, je spojován se schopností tolerantnějších genotypů lépe absorbovat vodu z půdy a/nebo lepší schopností zabránit ztrátám vody přes průduchy (např. Keyvan, 2010). V našich experimentálních podmínkách byly rostliny vytaženy z půdy, proto zde mohl působit pouze druhý faktor, tedy regulace transpirace, ale mohly zde působit ještě další faktory. Rostliny odrůdy Meritto rostly rychleji, měly v daných podmínkách o jeden list více, a proto měly v listových pletivech k dispozici více vody pro distribuci do mladších částí rostliny. Hodnoty RWC a aktivita genů byla sledována vždy u druhého listu odshora.

Odrůda Venistar by měla mít dle Smutné a Ryškové, 2012 vyšší míru adaptace na suché podmínky prokázanou víceletými polními pokusy. Hodnota RWC u odrůdy Venistar však padá pod 70 % (obr. 2) již po 25 minutách od vytažení z truhlíku. V dané fázi růstu rostliny této odrůdy nevykazovaly vyšší odolnost než rostliny ostatních odrůd. Schonfeld et al. (1988) došel k závěru, že při vyšším stresu pšenice suchem klesá RWC a obvykle, ale ne vždy, v podmínkách sucha mají kultivary s vyšší odolností k suchu vyšší hodnotu RWC. Ritchie et al. (1990) uvádí, že vyšší RWC je výsledkem lepší osmotické regulace nebo méně pružných buněčných stěn. Relativně vysoká úroveň exprese genu *Wdhn13* by mohla ukazovat na přítomnost dalších ochranných mechanismů, které se mohou projevit v přirozených podmínkách (růst v půdě). Součástí mechanismů její adaptace na suchu by mohla být obecně vyšší úroveň exprese genů ze skupiny *Cor/Lea*.

Tab. 1 Korelační koeficienty (r) vyjadřující vztahy mezi relativní expresí genů *Wdhn13* a *Wrab17* a fyziologickým stavem rostlin jednotlivých odrůd/linie vyjádřeným hodnotami RWC a OP v průběhu postupného vysychání rostlin

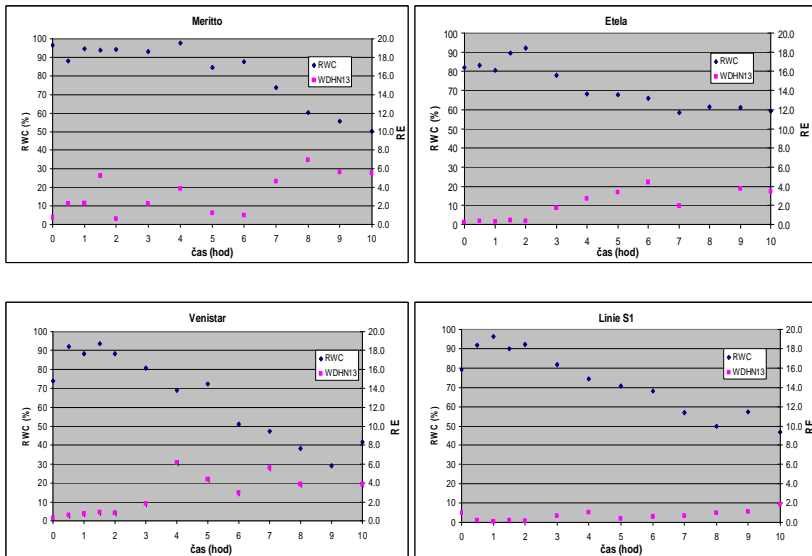
VEN	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.70**	-0.55*
OP	-0.54*	-0.87**
ETE	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.78**	-0.43
OP	-0.73**	-0.35
MER	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.75**	-0.14
OP	-0.33	-0.05
S1	<i>RE Wdhn13</i>	<i>RE Wrab17</i>
RWC	-0.81**	-0.58*
OP	-0.64**	-0.65**

** $P=0,01$, * $P=0,05$

U rostlin ječmene jarního bylo pozorováno (Mikulková et al, 2009), že aktivace některých dehydrinových genů u tolerantnějších genotypů byla zaznamenána později, pravděpodobně v souvislosti s odlišným fyziologickým stavem rostlin za stejných aktivčních podmínek ovlivněným pravděpodobně odlišnou mírou nebo způsobem adaptace na sucho.

Na obrázku 2 je znázorněn vztah mezi regulací exprese genu *Wdhn13* a RWC při postupném usychání listů. Odrůda Meritto a Etela reagují při poklesu hodnoty RWC vzrůstem aktivace exprese genu *Wdhn13*. Syrská syntetická linie reaguje na ztrátu vody z listů vyjádřenou hodnotou RWC pouze nízkým nástupem relativní exprese genu *Wdhn13*.

Obr. 2 Vzájemný vztah mezi regulací exprese genu *Wdhn13* a postupem usychání listů daným hodnotami RWC u hodnocených odrůd/linie



ZÁVĚR

V podmínkách tohoto experimentu byl prokázán jednoznačný vztah mezi ztrátou vody z listových pletiv a úrovní exprese genů *Wdhn13* a *Wrab17* u pšenice ozimé.

Opakovaně se projevíly vazby tolerantnějších odrůd na dřívější nástup a/nebo vyšší úroveň exprese genů ze skupiny Cor/Lea.

Na základě hodnocení následujících parametrů stresové reakce (změny RWC, OP, a relativní exprese genů *Wdhn13* a *Wrab17*) se jako nejvíce tolerantní genotyp jevila odrůda Meritto. Rostliny této odrůdy nejdéle držely vodu v listových pletivech nad úrovní RWC = 70 % a byl u nich zaznamenán nejrychlejší nástup ochranné reakce na úrovní aktivace genu *Wdhn13*. Pozorované vlastnosti by mohly přispívat k výnosové stabilitě této odrůdy.

LITERATURA

- Atienza, S. G., Faccioli, P., Perrota, G., Dalfino, G., Zschiesche, W., Humbeck, K., Stanca, M., Cattivelli, L. (2004) Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Science* 167: 1359-1365.
- Barr, H. D., Weatherley, P. E. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15:413-428.
- Bláha, L. (2011) Znaky adaptability k podmínkám stresu u zemědělských plodin. *Úroda* 59 vědecká příloha 10:726-734
- Fisher, R. A. and Wood, J. T. (1979) Drought resistance in spring wheat cultivars, III. Yield association with morpho-physiological traits. *Australian Journal of Agricultural Research* 30, 1001-1020.
- Holková L, Prášil IT, Bradáčová M, Vítámvás P, Chloupek O (2009): Screening for frost tolerance in wheat using the expression of dehydrine genes Wcs120 and Wdhn13 at 17 °C. *Plant Breed* 128: 420-422.
- Kamoshita, A., Babu, R. C., Boopathi, N. M. and Fukai, S. (2008) Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. *Field Crops Research* 109: 1-23.
- Keyvan, S., (2010) The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of animal and plant science*, vol. 8, 1051-1060. ISSN 2071-7024.
- Kobayashi F, Ishibashi M, Takumi S (2008): Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 17(5): 755-67.
- Mikulková. P., Holková, L., Hronková, M., Klemš, M., Bradáčová, M. (2009) Efficiency of differential laboratory methods for selection od drought tolerance barley genotypes. *Cereal Research Communications* 37, Supplement: 277-280.
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007.
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G, Perrotta C (2006): Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ* 29 (12): 2143-2152.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide komparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., Holaday, A. S., (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop science* 30: 105-111.

Shabala, S. (2012) Plant stress physiology. CABI, ISBN-13: 978-1-84593-995-3

Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F., Mornhinweg, D. W. (1988) Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop science* 28: 526-531

Smutná, P., Ryšková, T. (2012) Evaluation of stress susceptibility in winter wheat varieties using drought tolerance indices. *Növénytermelés* 61, Supplement: 41-44

Suprunova, T., Krugman, T., Fahima, T., Chen, G., Shams, I., Korol, A., Nevo, E., (2004) Differential expression of dehydrin genes in wild barley (*Hordeum spontaneum*), associated with resistance to water deficit. *Plant, Cell and Environment* 27:1297-1308.

Tahara, M., Carver, B. F., Johnson, R. C. and Smith, E. L. (1990) Relationship between relative water-content during reproductive development and winter wheat grain yield. *Euphytica* 49: 255-262.